

ВІДГУК

офіційного опонента
на дисертаційну роботу Станіслава Валентиновича
«Молекулярно-генетична та функціональна характеристика мембранних
транспортерів, залучених до регуляції соле- та посухостійкості у рослин та
детоксифікації арсену»,
подану на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика

Не викликає жодних сумнівів актуальність дисертаційної роботи С.В.Ісаєнкова, яка присвячена дослідженню мембранних транспортерів мінерального обміну, встановленню їх ролі у підтриманні осмотичного та іонного гомеостазу, механізмів транспорту, а також їх участі у детоксифікації сполук арсену.

Серед стресових чинників, які призводять до значних втрат урожаїв сільськогосподарських культур, засолення ґрунту та посуха є одними з найбільш розповсюджених. Проблема стійкості культурних рослин до дії стресових чинників та підвищення їхньої продуктивності є ключовою для світового аграрного комплексу. Рослини не здатні до активної локомоції і через це не в змозі безпосередньо уникати дії несприятливих чинників середовища. Натомість організми рослин здатні на рівні метаболізму активно реагувати на змінні стресові стани навколишнього середовища у результаті постійної адаптації власних функцій впродовж життєвого циклу. Рослинним організмам притаманні особливі регуляторні механізми, які дозволяють їм точно оцінювати переважаючу більшість параметрів власного оточення та модулювати клітинні регуляторні системи для підтримання внутрішнього гомеостазу. Підтримання іонного гомеостазу також є критично важливим для рослин у механізмах протидії умовам сольового стресу. Процеси, необхідні для іонного гомеостазу, включають закачування іонів в клітину, їх депонування, експорт та дистальний транспорт. Наразі значного прогресу досягнуто у молекулярній характеристиці іонних транспортерів та виявленні їх функціональної ролі у процесах формування стійкості до сольового стресу. У вищих рослин, іони, зокрема натрію та калію викачуються з клітини або компарменталізуються у вакуолях

в основному завдяки роботі Na^+/H^+ антипортерів. На сьогодні виявлено багато генів, які кодують Na^+/H^+ антипортери у геномі різушки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Першим геном Na^+/H^+ антипортера рослин, який був функціонально охарактеризованим, є AtNHX1, що кодує антипортери тонопластів. Позитивна роль AtNHX1 у процесах формування стійкості до умов сольового стресу була показана у трансгенних рослин різушки Таля. При скринінгу мутантів арабідопсису, які демонстрували гіперчутливість до NaCl при рості, було визначено декілька гіперчутливих (SOS) локусів. Серед них - SOS1, що кодує Na^+/H^+ антипортер розташований на плазматичній мембрані

Про важливість та актуальність дисертаційної роботи свідчить і те, що вона виконувалася в рамках бюджетних тем Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» у відділах геноміки та молекулярної біотехнології та рослинних харчових продуктів та біофортificaції, у рамках бюджетної теми та проектів цільових комплексних міждисциплінарних програм наукових досліджень НАН України

Мета досліджень та завдання дисертаційної роботи логічно пов'язані і поступово розкриті у вступі, основній частині, що містить 4 розділи, включаючи огляд літератури та розділи експериментальних досліджень, з наступним узагальненням отриманих результатів, формуванням практичних рекомендацій та висновків. Дисертаційна робота викладена на 306 сторінках машинописного тексту, містить список з 456 джерел цитованої літератури, 87 рисунків та 5 таблиць.

Перший розділ дисертаційної роботи, огляд літератури, задуманий та виконаний добре, охоплює всі аспекти проблеми, зокрема питання організації та функціонування внутрішньоклітинної системи транспорту іонів натрію та калію у рослин, аналіз метаболізму клітини, пов'язаного із сольовим стресом та дефіцитом води. Значна увага приділена механізмам транспорту та детоксифікації арсену у живих організмів. Слід відмітити глибоке знання дисертантом стану досягнень досліджуваної проблеми та використання сучасних літературних джерел з широкого кола досліджених ним питань.

В розділі 2 дисертаційної роботи детально описано широкий арсенал використаних методів досліджень, які забезпечують достовірність та значимість результатів і включають молекулярно-генетичні, біотехнологічні, біохімічні, мікроскопію, аналіз ряду функцій клітин, класичний статистичний аналіз результатів та біоінформатичні підходи. Їх детальний опис викладено на 56 сторінках з використанням майже 40 джерел літератури.

З'ясування на молекулярному рівні процесів поглинання, транспорту та накопичення в тканинах рослин ключових моновалентних іонів, зокрема, натрію та калію, є важливою складовою для аналізу механізмів підтримання іонного гомеостазу, що лежать в основі солестійкості рослин. Важливе значення має також розуміння процесів транспорту та виведення токсичних сполук, перш за все сполук арсену в рослинах.

У розділі 3.1. наведені результати дослідження мембранного транспортеру *NvNKT2;1*, проведено аналіз шляхів його участі у формуванні солестійкості та підтримання іонного балансу в рослин ячменю. Відсутність іонів калію у середовищі культивування обумовлювало значне зростання рівня транскриптів *NvNKT2;1* у коренях і дещо нижче у листках. Окрім того, слід зазначити, що культивування рослин у розчині хлориду натрію (50 мМ) збільшувало рівень експресії цього гена в шість разів тільки у листках. Надекспресія вказаного гена у досліджуваних рослинах обумовлює транслокацію іонів натрію із коренів до тканин пагонів та листя, підвищує його вміст у, що забезпечувало підвищення солестійкості рослин ячменю.

У розділі 3.2. дисертантом приведено філогенетичне різноманіття протонно-натрієвих обмінників (NHX) та описано роль деяких NHX-білків з ячменю у процесах соле- та посухостійкості рослин. За результатами кладистичного аналізу було виділено 4 клади NHX-подібних послідовностей із чіткими ознаками та об'єднанням з більш дослідженими контрольними білками з рослин різущки Таля. В процесі проведення кладистичного аналізу дисертантом була ідентифікована нова клада, до якої належить *AtNHX3* різущки Таля та його гомологи.

С.В.Ісаєнков дослідив вплив експресії гена протонно-натрієвого обмінника *HvNHX2*, виділеного з рослин ячменю на рівень солестійкості рослин в тканинах тютюну. Рослини тютюну були трансформовані генетичною конструкцією із геном протонно-натрієвого обмінника *HvNHX2* з рослин ячменю. Автором були відібрані лінії рослин, що експресують *HvNHX2*, та використані для оцінки їх солестійкості. Проведені експерименти вказують на те, що привнесення гена протонно-натрієвого обмінника ячменю *HvNHX2* у геном тютюну значно підвищувало параметри солестійкості трансформантів. Таким чином, запропонований підхід підвищення солестійкості рослин шляхом експресії генів протонно-натрієвих обмінників родини NHX має перспективи для широкого застосування у біотехнологічному покращенні корисних сільськогосподарських рослин та використанні їх для вирощування в зонах ризикованого землеробства.

Розділ 3.3. присвячений аналізу роль двопорових калієвих каналів родини TRK у рості та розвитку рослини і регуляції сольового та водного стресів. Дисертантом не лише проведено відбір відомих послідовностей TRK та зроблено філогенетичний аналіз, приведено також результати клонування ряду представників родини TRK з різних видів рослин. Автором дано характеристику 157 унікальних послідовностей потенційних калієвих каналів родини TRK на основі аналізу специфічної доменної архітектури. Відмічено високий ступінь дивергенції серед послідовностей досліджених каналів родини TRK. За результатами кладистичного аналізу виділено 4 клади TRK – подібних послідовностей із чіткими ознаками та об'єднанням з більш дослідженими контрольними білками з рослин різущки Таля.

Значна увага в дисертаційній роботі відведена аналізу шляхів поглинання, метаболізму в клітинах та виведення із рослин сполук арсену. У розділі 3.4. аналізується регуляція експресії генів фосфатних транспортерів за умов колонізації різними видами арбускулярних грибів та дефіциту фосфору. Аналізуючи локалізацію чотирьох родин транспортерів фосфату, дисертант приділяє особливу увагу дослідженню представників родини PHT1, які є

транспортерами високої афінності та локалізовані у плазматичній мембрані. Автор зазначає, що рослини не мають спеціалізованих систем транспорту арсенатів, а схожість фізико-хімічних властивостей фосфатів та As^V забезпечує участь фосфатних транспортерів у поглинанні кореневою системою п'ятивалентного арсену. Арсен у навколишньому середовищі існує в двох хімічних формах - три і п'ятивалентний, тривалентний арсен є більш токсичним. Зважаючи на те, що поглинання п'ятивалентного арсену рослинами із навколишнього середовища відбувається винятково за допомогою фосфатних транспортерів, дисертант прогнозує участь цих транспортерів у поглинанні рослинами арсену.

Участі білків аквапоринів у поглинанні та транспорті арсену рослинами присвячено розділ 3.5. дисертаційної роботи. Здатність цих мембранних протеїнів, забезпечувати транспорт не лише води, а й ширшого спектру сполук, вказує на можливість залучення до цих процесів арсену. В експериментах з використанням рослин різущки Таля, переконливо продемонстровано, що аквапорину AtNIP7;1 належить ключова роль у поглинанні трьохвалентного арсену рослинами з навколишнього середовища.

Застосування дріжджової системи ScACR3 для створення рослин із покращеною стійкістю до арсену присвячено розділ 3.6. Завдяки властивостям ScACR3, що є антипортером, який функціонує завдяки наявності протонного градієнта на плазматичній мембрані та здатен виводити трьохвалентний арсен із клітин дріжджів (вищі рослини не мають гомологів до ScACR3), Станіслав Валентинович використав підхід із трансформацією рослин різущки Таля та протопластів цієї рослини геном ScACR3 або геном злитого із репортерним геном *EYFP-ScACR3:EYFP*. Важливе значення було приділено встановленню локалізації білка в клітинах. Встановлено, що найбільш ймовірним місцем локалізації ScACR3 у рослинній клітині є плазматична мембрана. Дисертантом переконливо показано, що експресія гена дріжджової системи для видалення арсену ScACR3 під контролем конститутивного промотору може призводити до збільшення його накопичення у пагонах. Результати вказаних досліджень

закладають основу у формуванні рослин для фітореMediaції забруднених арсеном ґрунтів, а отримані результати мають, як фундаментальне так й очевидне практичне значення.

Разом з тим, слід відмітити, що автор захоплюється використанням назв рослин латинською, не завжди використовуючи їх відповідні україномовні назви.

Дисертаційна робота є цілісним, завершеним самостійним дослідженням, яке має перспективи подальшого розвитку. Висновки сформульовані здобувачем чітко та коректно. Зміст автореферату цілком відповідає змісту дисертаційної роботи.

На підставі викладеного, вважаю, що дисертаційна робота Ісаєнкова Станіслава Валентиновича «Молекулярно-генетична та функціональна характеристика мембранних транспортерів, залучених до регуляції соле- та посухостійкості у рослин та детоксифікації арсену» за актуальністю, обсягом і змістом проведених досліджень, за науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів без сумніву відповідає вимогам п.п.11,12,13 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Завідувач відділу молекулярних механізмів регуляції метаболізму клітини Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, доктор біол. наук, професор

В.С. Кравець

15.04.2016 р.

